مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۴، سال ۱۳۸۲ (۸۰۷-۷۹۳)

بررسی تاثیر سودوموناسهای فلورسنت روی قارچ *Pythium ultimum* Trow عامل پوسیدگی بذر لوبیا

مسعود احمدزاده[۱]، عباس شریفی تهرانی[۲]، قربانعلی حجارود[۳]، جواد زاد[۴]، محمود اخوت[۵] و مجتبی محمدی[۶]
۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، دانشجوی دوره دکتری، استادان و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۱/۲۷

خلاصه

در سالهای اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی خاکزاد مورد توجه جدی محققین قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به باکتریهای آنتاگونیست بخصوص از باکتریهای گروه سودوموناسهای فلورسنت در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی اشاره کرد. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیکی هستند زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشند. در این تحقیق تاثیر ٤١ جدایه باکتری در کنترل گونه ***Pythium ultimum sporangiferum* var.** روی ریشه گیاه لوبیا مورد بررسی قرار گرفت. اغلب کلنی‌های رشد یافته روی محیط اختصاصی اس یک تولید رنگدانه فلورسنت کردند. با توجه به نتایج تستهای بیوشیمیایی، جدایه‌های **Pf18** و **Pf23** (جدا شده از مزارع لوبیای شهرستان خمین) و جدایه **Pf26** از مزارع لوبیای دانشکده کشاورزی کرج به عنوان گونه***Pseudomonas putida*** تشخیص داده شدند. جدایه‌های **Pf13** و **Pf22** بعلت عدم قطعیت در تشخیص به عنوان ***Pseudomonas sp.*** شناسایی شدند. جدایه‌های **Pf8, Pf15, Pf16, Pf26, Pf27** و نیز استرین **CHAO** رشد قارچ داشتند. بهترین تأثیر را در جلوگیری از رشد ***P.ultimum*** در شرایط آزمایشگاهی داشتند. جدایه‌های **Bs4**، **Pf6** و **Pf20** هیچ گونه تأثیری در کاهش رشد این گونه نداشتند. به غیر از ۱۰ جدایه شامل جدایه‌های **Pf6, Pf29, Pf25, Pf24, Pf20, Pf19, Pf14, Pf10, Pf9** و **Pf31** که قادر به محافظت از بذر نبودند بقیه باکتریها با ممانعت از رشد قارچ بیمارگر، امکان جوانه‌زنی بذر لوبیا در محیط کشت را باعث شدند. از بین ریزوباکتریهای آنتاگونیست مورد استفاده فقط ١٦ جدایه شامل **Pf2, Pf4, Pf8, Pf9, Pf13, Pf14, Pf15, Pf16, Pf18, Pf22, Pf26, Pf27, Pf28, Pf31** و **Pf32** و نیز استرین **CHAO** تولید سیانید هیدروژن کردند. ١٤ جدایه شامل **Pf1, Pf5, Pf6, Pf7, Pf12, Pf15, Pf20, Pf21, Pf23**، **Pf25, Pf27, Pf28** و **Pf32** و نیز استرین **CHAO** تولید پروتئاز کردند. جدایه‌های **Pf1, Pf13, Pf16, Pf26, Pf27** و **Pf32** و نیز استرین **CHAO** با توجه به اندازه قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتریها بیشترین تولید سیدروفور را داشتند. جدایه‌های ***B. subtilis*** و نیز جدایه‌های **Pf11, Pf17, Pf20** و **Pf23** اصلا تولید سیدروفور نکردند. هیچیک از جدایه‌های مورد آزمایش نتوانستند درون لوله آزمایش حاوی محیط سلولاز باعث تغییر رنگ کاغذ صافی بشوند. جدایه‌های **Pf16** و**Pf26** بهترین اثر را در افزایش وزن تر بوته‌های لوبیا در خاک آلوده به ***P. ultimum*** در شرایط گلخانه داشتند و به همراه شاهد سالم در یک گروه قرار گرفتند. بهترین تأثیر مربوط به جدایه **Pf16** بود. بیشترین قدرت کلونیزاسیون ریشه مربوط به جدایه‌های **Pf4, Pf7, Pf13** و **Pf28** بود.

واژه‌های کلیدی: لوبیا، کنترل بیولوژیکی، سودوموناسهای فلورسنت

مکاتبه کننده: مسعود احمدزاده

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

از بین بیماری‌های مربوط به ریشه لوبیا، بیماری پوسیدگی بذر، ریشه و بوته‌میری در اثر گونه *Pythium ultimum* Trow از شایع‌ترین آنها می‌باشند (۲). گسترده بودن دامنه میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی، بالا بودن قدرت بیماری‌زایی، انگل اختیاری بودن و توانایی زیاد در باقی ماندن بحالت ساپروفیتی در غیاب گیاه میزبان این گونه را از نظر بیماری‌زایی با اهمیت نموده و کارآیی برخی روش‌های زراعی مانند آیش و تناوب را در کنترل بیماری کاهش داده است. برخی روش‌های زراعی از قبیل رعایت فاصله کافی بین بوته‌های لوبیا به منظور تهویه بهتر خاک و کاهش سایه‌انداز و جلوگیری از انتقال عامل بیمارگر بین ریشه‌ها از اقداماتی است که می‌تواند در کنترل بیماری موثر واقع شود. ضد عفونی بذر با قارچ‌کشهای ضد ائومیست[1] نیز تا اندازه‌ای در کاهش بیماری موثر است. تعدادی ارقام مقاوم به بیماری شناسایی شده‌اند که متاسفانه در شرایط مزرعه دوام چندانی نداشته و پس از چند سال استفاده، مقاومت آنها شکسته شده است.

تاثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل بیماریهای گیاهی خصوصا بیمارگرهای خاکزی وهزینه‌های اقتصادی آن از یک طرف و نگرانی‌های زیست محیطی از طرف دیگر، دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به عنوان یک چالش جدی فراروی محققان قرار داده است. در سالهای اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسمهای آنتاگونیست بخصوص از گروه باکتریهای متعلق به سودوموناسهای فلورسنت (از قبیل *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida*) و تعدادی از گونه‌های باسیلوس (Bacillus) در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی اشاره کرد. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیکی هستند زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشند (۲۳). سودوموناسهای فلورسنت بخش قابل توجهی از جمعیت بومی در خاک‌هایی که بطور طبیعی بازدارنده بوده و نیز خاک‌هایی که بطور مستمر زیر کشت یک محصول[2] قرار گرفته‌اند و یا با استفاده از تشعشع خورشیدی پاستوریزه شده‌اند می‌باشند (۲۰).

بررسی منابع منتشر شده نشان می‌دهد که اول گزارش در مورد نقش سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل بیماری‌های گیاهی مربوط به (۹) می‌باشد. این دو محقق خواص آنتاگونیستی *P. fluorescens* علیه قارچ *Rhizoctonia solani* وی پنبه و در سال بعد علیه *Pythium ultimum* را روی همین گیاه به اثبات رساندند. همچنین موفق شدند نقش آنتی بیوتیک پایولوتئورین[3] را در این بازدارندگی نشان بدهند (۱۰). تا کنون تاثیرریزوباکتریهای آنتاگونیست بخصوص ازگروه سودوموناسهای فلورسنت و برخی گونه‌های جنس باسیلوس در کنترل بسیاری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه اغلب گیاهان زراعی به اثبات رسیده است (۳، ۲۱، ۲۳). باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر از گروه سودوموناس‌های فلورسنت بطور مستقیم با تولید یک سری هورمونهای گیاهی و تحریک رشد گیاه، و نیز بصورت غیر مستقیم از طریق کنترل بیولوژیکی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آنها می‌شوند(۲۳). تولید آنتی بیوتیک (۷)، سیدروفور (۱۴، ۲۱)، سیانید هیدروژن (۱۳) و انزیم پروتئاز (۱۳) از مهمترین مکانیسم‌های موثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتریها بشمار می‌رود. اغلب میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی در شرایط کمبود آهن تولید موادی با وزن ملکولی کم (۵۰۰ تا ۱۰۰۰ دالتون) نموده که تمایل زیادی به تشکیل کمپلکس با آهن سه ظرفیتی (یون فریک) دارند. نقش اصلی این مواد تامین آهن برای سلول است (۱۴). سیدروفورها ضمن افزایش رشد گیاه، در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی نیز موثرند. یکی دیگر از متابولیتهای میکروبی که بوسیله سودوموناسهای فلورسنت تولید می‌شوند سیانید هیدروژن می‌باشد که روی سیستم جذب مواد غذایی تاثیر می گذارد. جذب مواد غذایی توسط گیاه یک فرآیند انرژی‌خواه است. بر اساس مطالعات صورت گرفته حدود ۶۰ درصد انرژی ناشی از تنفس ریشه گیاه ذرت به این فرآیند اختصاص دارد. تولید انرژی بصورت بسته‌های ATP در سیستم

1 . Oomycetes

2 . Monoculture

3 . Pyolutorin

Archive of SID

www.SID.ir

تنفسی سیتوکروم اکسیداز بوسیله سیانید هیدروژن ممانعت می‌شود و باعث می‌گردد تا الکترونهای آزاد شده بوسیله اکسیداسیون NADH در میتوکندری از سایر مسیرهای تنفسی دیگر که مقاوم به سیانید هیدروژن است به اکسیژن برسد. لذا اتلاف انرژی در این حالت افزایش یافته و در نهایت باعث اختلال در رشد طبیعی گیاه می‌گردد (۲۱).

بر اساس نتایج کارهای (۱۱) تعدادی از استرین‌های *P. fluorescens* روی گونه *P. ultimum* عامل بوته‌میری نخود، اثرات مشابهی با قارچ‌کشهای متالاکسیل و کاپتان داشت. قدرت جوانه‌زنی و افزایش عملکرد برای تیمار متالاکسیل در تمام آزمایش‌ها معادل یا بیشتر از سایر تیمارها بود. براساس نتایج کارهای (۲۲) تیمار بذور نخود باباکتری *P. fluorescens* استرین Q29z-80 تاثیر مشابهی با کاربرد قارچ‌کشهای متالاکسیل و کاپتان در شرایط مزرعه داشت. محققین در حال حاضر به دنبال پیدا نمودن خصوصیاتی از باکتری‌های آنتاگونیست که در افزایش قدرت رقابت در محیط ریزو سفر و کارآیی آنها موثر است می‌باشند. این موضوع به آنها امکان می‌دهد تا با استفاده از مهندسی ژنتیک خصوصیات مورد نظر را در یک باکتری معین وارد نمایند. بررسی تاثیر عوامل محیطی روی تولید متابولیتهای ضد میکروبی و نیز یافتن روش‌های سریع و آسان شناسایی باکتریهای آنتاگونیست از دیگر موضوعات مهمی است که درسال‌های اخیر مورد توجه جدی مراکز علمی جهان و ایران قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی جنس *Pythium*

بذور پوسیده، پس از آماده‌سازی را به محیط آب آگار ۲ درصد حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفمپیسین[1] منتقل نموده و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، انتهای هیف کلنی به محیط کشت سیب‌زمینی- هویج- آگار (PCA) منتقل و در دمای یخچال نگهداری شد. برای جداسازی مستقیم و برآورد جمعیت قارچ یک گرم خاک کاملا خشک و نرم با ۱۰ میلی‌لیتر آب سترون بهم زده شد و رقت‌های مختلفی از آن تهیه و ۰/۲ میلی‌لیتر از هر کدام روی محیط کشت انتخابی (حاوی ۲ گرم ساکارز، ۰/۷ گرم دی فسفات پتاسیم، ۳۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین، ۰/۵ گرم کربنات کلسیم، ۰/۲ گرم عصاره مخمر، ۱ گرم نیترات پتاسیم، ۱۲۰ میلی‌گرم پیمارسین و ۷۰ میلی‌گرم قارچ‌کش PCNB) منتقل و بصورت وارونه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد نگهداری شد. با توجه به متوسط تعداد کلنی در تشتک‌ها و میزان خاک مورد استفاده، جمعیت قارچ در هر گرم خاک محاسبه گردید.

شناسایی گونه *Pythium*

تشخیص گونه بر اساس منوگراف دیک (۱۹۹۰) صورت گرفت. سرعت رشد شعاعی روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی، رنگ و منظره کلنی، اندازه‌گیری قطر ائوگون[2]، ائوسپور[3]، ائووپلاست[4] و ضخامت دیواره ائوسپور، منشا آنتریدی و نحوه اتصال آن به ائوگون تعیین گردید. این پارامترها با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ میکروسکوپ اندازه‌گیری گردید. هر عدد از میانگین دو قطر بدست آمد. شاخص‌های ائووپلاست آپلروتیک و دیواره با استفاده از فرمول‌های دیک محاسبه شد (۵). برای تولید اندام‌های جنسی این قارچ (آنتریدی و ائوگون) از محیط کشت هویج – سیب‌زمینی – آگار (PCA) استفاده شد.

تهیه مایه تلقیح *Pythium* و اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه

برای تهیه مایه تلقیح *Pythium* از روش مارهوفر و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا قارچ *Pythium* روی محیط کشت مالت آگار بمدت ۷ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس یک قطعه ۶ میلی‌متری از محیط کشت حاوی قارچ در یک ارلن ۳۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ گرم بذر ارزن اتوکلاو شده و ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار داده شد. این ارلن بمدت دو هفته در مدت دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. چهار گرم مایه تلقیح به ازاء یک کیلوگرم خاک برای جنس *Pythium* اضافه و در هر گلدان ده عدد بذر کاشته شد. علائم *Pythium* بصورت پوسیدگی بذر و تغییر رنگ و کاهش جوانه‌زنی ظاهر شد. برای هر تیمار سه تکرار در یک طرح کاملا تصادفی بکار رفت. از بذر لوبیا رقم

1 . rifampicin

2 . Oogonium

3 . Oospore

4 . Oosplast

Archive of SID
www.SID.ir

اصلاح شده بهمن (از گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی) برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر و نگهداری آنها

برای جداسازی سودوموناسهای فلورسنت از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. به این ترتیب که بذور پس از ضد عفونی سطحی در گلدان حاوی ۴۰۰ گرم خاک کاشته شد. پس از چهار هفته نگهداری در تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور و رطوبت ۷۰٪، خاک به آرامی از روی ریشه شسته شد. سپس ریشه‌ها درون یک ظرف حاوی آب سترون روی شیکر قرار گرفت و بمدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد تیمار شد. ریشه به قطعات یک سانتی‌متری بریده و روی محیط اس‌یک (S1) یا محیط کینگ ب (KMB) قرار گرفت. تشتک‌ها بمدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا کلنی‌های باکتری ظاهر شود. باکتریهایی که زیر نور ماوراء بنفش از خود خاصیت فلورسانس نشان دادند به محیط NA منتقل شدند. باکتری استاندارد *Pseudomonas fluorescens* استرین CHAO نیز از دانشگاه پلی تکنیک زوریخ کشور سوئیس دریافت گردید.

شناسایی سودوموناسهای فلورسنت

۳۴ جدایه بر اساس روش‌های شاد و همکاران (۲۰۰۱) از نظر واکنش‌های گرم، کاتالاز، اکسیداز، رشد بی‌هوازی، هیدرولیز نشاسته، تولید آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان (کلنی لعابدار و برجسته) از سوکروز روی محیط آگار مغذی حاوی سوکروز پنج درصد، احیای نیترات، مصرف د- آرابینوز و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ ب مورد بررسی قرار گرفتند. برای تفکیک گونه *P. fluorescens* ازگونه *P. putida* از واکنش رشد روی قند ترهالوز استفاده شد. این جدایه‌ها در لوله‌های سرپوش‌دار حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول یک دهم مولار سولفات منیزیم در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند.

آماده‌سازی بذور، آغشتگی به ریزوباکتریها و قارچ‌کشها و تعیین جمعیت باکتریها روی بذور تیمار شده

آماده‌سازی بذور لوبیا مطابق روش ولر و کوک (۱۹۸۶) انجام شد با این روش جمعیت باکتری به $10^{8}\times5$-۱ واحد تشکیل دهنده کلنی رسید. به ازاء هر ۵۰ گرم بذر، محتویات چهار تشتک پتری حاوی باکتری رشد یافته در ۲۵ میلی‌لیتر محلول یک درصد سلولز ریخته شد (برای جدایه‌های *B. subtilis* از محتویات پنج تشتک استفاده شد). برای تعیین میزان جمعیت باکتری، ۱۰ عدد بذر تیمار شده در یک هاون حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با اسیدیته ۷/۲ خرد شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} تا 10^{-8} روی محیط کشت کینگ ب (محیط آگار مغذی برای جدایه‌های *B. subtilis*) پخش گردید و پس از رشد باکتریها با شمارشگر کلنی میزان واحد تشکیل دهنده کلنی محاسبه شد.

برای آغشته نمودن بذور به قارچ‌کشهای مورد آزمایش مطابق روش کیل و همکاران (۱۹۸۹) قارچ‌کش‌های متالاکسیل (ریدومیل ۲۵ درصد) به میزان ۰/۵ گرم ماده مؤثره به ازاء هر کیلو گرم بذر با اضافه نمودن ۳ میلی‌لیتر آب مقطر برای ۱۰۰ عدد بذر درون ارلن ۵۰۰ لیتری بکار رفت. ارلن‌ها را بمدت ۲ دقیقه به آرامی تکان داده و سپس درون هود سترون بمدت ۳ ساعت خشک گردید. ترکیب تجاری تریکودرمین بر اساس توصیه شرکت سازنده به میزان ۱۰ گرم پودر به ازاء هر کیلوگرم بذر در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به آرامی مخلوط شد.

بررسی قدرت بازداری از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک پتری

برای تعیین قدرت بازدارندگی از رشد *P. ultimum* در آزمایشگاه از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد به این ترتیب که باکتریها بصورت نقطه‌ای یا خطی روی محیط کشت مالت آگار به فاصله ۰/۵ سانتی متر از لبه تشتک کشت داده شد و یک ساعت بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ مورد نظر در وسط تشتک پتری قرار گرفت. در این روش باکتری که قبلا بمدت ۸ ساعت در محیط مایع مغذی[1] شامل پپتون و عصاره مخمر کشت داده تا در فاز لگاریتمی رشد قرار گیرد. برای هر باکتری سه تکرار بکار رفت. تشتک‌ها بمدت ۴ تا ۷ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی بدون در نظر گرفتن شعاع آن به عنوان واکنش مثبت بازداری از رشد قارچ تلقی شد. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله

1 . Nutrient broth

Archive of SID

www.SID.ir

کلنی باکتری تا میسلیوم قارچ اندازه‌گیری و میانگین آنها بر اساس آزمون t-student در سطح ۵٪ مقایسه شد.

بررسی امکان محافظت از بذر در مقابل قارچ‌های بیماری‌زا درون پتری

از بذور تیمار شده با متیل سلولز یک درصد بعنوان شاهد استفاده شد. برای هر تیمار سه تکرار بکار رفت. بذور آغشته شده به باکتری در اطراف تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و بلافاصله قطعه آگار حاوی قارچ عامل بیماری در وسط آن قرار گرفت. پس از یک هفته نگهداری در دمای ۲۵ درجه، میزان قدرت حفاظت از بذر علیه عامل بیماری و امکان جوانه‌زنی آنها در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

بررسی تولید برخی متابولیت‌های میکروبی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی

تولید سیدروفور

برای‌بررسی‌تولیدسیدروفورازروش شین و نیلندز (۱۹۸۲) استفاده شد. در این روش از محیط (CAS)[1] استفاده گردید. که از ترکیب سه محلول بدست می‌آید:

محلول اول: ۳۰/۲۴ گرم پیرازین بیس اتان سولفونیک اسید (Pipes) با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط شد، اسیدیته آن با سود یک نرمال به ۶/۸ رسید و سپس ۵ گرم کازآمینواسید اضافه گردید و به همراه ۱۲ گرم آگار در ۱۲۱ درجه بمدت ۱۵ دقیقه سترون شد.

محلول دوم: ۶۰/۵ میلی‌گرم از CAS در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محلول سه ظرفیتی آهن (10 mM $FeCl_3.6H_2O$, 10mM HCl) به آن اضافه شد. در ظرف دیگری ۷۲/۹ میلی‌گرم از ماده هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید (HDTMA) با ۴۰ میلی‌لیتر آب کاملا مخلوط و سپس با اضافه کردن آن به ظرف اول محلول دوم بدست آمد که جداگانه اتوکلاو گردید.

محلول سوم: ماده $MgCl_2.6H_2O$ را به میزان ۸۱۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب ریخته و بعد از هم زدن اتوکلاو شد. محلول دوم و سوم با یکدیگر مخلوط و در حالت بهم خوردن به محلول اول اضافه گردید. محیطی که بدست می‌آید آبی‌رنگ است که درون پتریهای سترون ریخته شد. با استفاده از یک لوپ باکتریها به صورت نقطه‌ای روی این محیط کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در صورتیکه باکتری تولید سیدروفور کند باعث تغییر رنگ محیط به نارنجی می‌شود که در اثر خارج ساختن آهن از محیط CAS می‌باشد. قطر هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتری با میزان سیدروفور رابطه مستقیمی دارد. میانگین بدست آمده برای هر باکتری بعنوان یک تکرار با استفاده از آزمون t-student با یکدیگر مقایسه شد. هر یک از مقادیر بدست آمده، میانگین سه آزمایش مستقل است.

تولید پروتئاز

تولید این آنزیم بر اساس روش مارهوفر و همکاران (۱۹۹۴) بررسی شد. ابتدا محیط کشت (SMA)[2] شامل ۱۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی و ۱۳/۵ گرم آگار باکتریولوژیک تهیه و درون اتوکلاو سترون شد. تشتک‌های حاوی محیط کشت SMA در ۲۷ درجه بمدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. تشکیل یک هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی باکتری نشانه فعالیت پروتئاز است.

تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش کاستریک و کاستریک (۱۹۸۳) استفاده شد: ابتدا سوسپانسیون هر یک از باکتریها از کشت ۲۴ ساعته بطور جداگانه در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر جدایه روی محیط کشت NA پخش شد. قطعاتی از کاغذ صافی به ابعاد ۱× ۱ سانتی‌متر در محلول معرف HCN غوطه‌ور گردید. این محلول شامل: ۵ میلی‌لیتر اتیل استواستات مس (II) Copper ethylaceto acetate، ۵ میلی‌گرم متیل بیس–ان–ان– دی‌متیل آنیلین (Methylene) bis(-n-n-dimethylaniline) و ۲ میلی‌لیتر کلروفرم می‌باشد. آنگاه قطعات کاغذ صافی آغشته به معرف مذکور درون درب تشتک پتری حاوی کشت باکتری آنتاگونیست قرار گرفت و بصورت وارونه در ۲۸ درجه نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی به رنگ آبی پس از ۱۸-۳ ساعت نشانه تولید سیانید می‌باشد.

تولید سلولاز

محیط سلولاز شامل ۱ گرم دی فسفات پتاسیم، ۰/۵ گرم

1 . Chrome Azurol S

2 . Skim milk agar

Archive of SID
www.SID.ir

نیترات سدیم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیوم، ۰/۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. درون هر لوله آزمایش ۹ میلی‌لیتر ریخته و در هر کدام یک کاغذ صافی به ابعاد ۱×۹ سانتی‌متر گذاشته شد. بنحوی که نیمی از کاغذ بیرون از سطح مایع قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری را وارد لوله کرده و در دمای ۲۵ درجه نگهداری شد. تا ۳ هفته پس از انجام آزمایش، هر روز کاغذهای صافی از نظر هرگونه تغییر رنگ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی‌خواص بازدارندگی سودوموناسهای فلورسنت در شرایط گلخانه علیه عامل بیماری

برای انجام این آزمایش از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) بشرح زیر عمل شد: پس از تهیه مایه تلقیح قارچ بیماری‌زا درون ارلن‌های حاوی ۲۵۰ گرم بذر ارزن و ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر، و اضافه کردن آن به خاک (چهار گرم مایه تلقیح در یک کیلوگرم خاک برای جنس *Pythium*) دو ساعت بعد ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری (10^7 × ۱واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر) به ازاء هر کیلوگرم بذر اضافه شد. سپس در هر گلدان ده عدد بذر کاشته شد. چهارده روز بعد (نگهداری در شرایط ۲۲ درجه، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) گلدان‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. پارامترهای مورد ارزیابی، تعداد بذور جوانه زده و سالم، و وزن تر بوته دو هفته پس از کاشت بود. برای هر تیمار سه تکرار در یک طرح کاملا تصادفی بکار رفت. این آزمایش دو مرتبه در شرایط یکسان تکرار شد.

بررسی کلونیزاسیون ریشه توسط باکتریهای آنتاگونیست

برای انجام این بررسی از روش کیل و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد. دو هفته پس از کاشت بذور آغشته به باکتریهای آنتاگونیست در آزمایش گلخانه‌ای در خاک آلوده به گونه *P. ultimum* برای هر تیمار سه گیاهچه انتخاب و ریشه‌های آنها توزین گردید. ریشه‌ها به قطعات کوچکتر بریده شد و درون ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۸۵٪ نمک طعام ریخته و بمدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد تا کاملا یکنواخت گردد. رقت‌های مناسب تهیه و با استفاده از پی پت پاستور مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه روی محیط کشت کینگ ب حاوی آنتی‌بیوتیک سولفات کانامایسین پخش گردید. پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت شمارش باکتری صورت گرفت که مؤید جمعیت باکتری روی ریشه می‌باشد.

نتایج

مشخصات گونه *Pythium ultimum* Trow

در اغلب موارد، نمونه‌های جدا شده از مزارع لوبیا در کرج، گونه *Pythium ultimum* Trow تشخیص داده شد. بررسی‌های دقیق‌تر نشان داد که واریته این گونه *sporangigerum* می‌باشد. در هیچ یک از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع خمین این قارچ مشاهده نشد. با استفاده از روش جداسازی مستقیم از خاک و تهیه سری رقت، جمعیت قارچ در خاک ۱۲۵ واحد تشکیل دهنده کلنی[1] در هر گرم خاک تعیین گردید. میسلیوم‌های این گونه روی محیط کشت PDA به رنگ سفید و با منظره پنبه‌ای بود.

مشخصات میکروسکوپی: هیف‌ها استوانه‌ای شکل به قطر متوسط ۴/۲ میکرومتر (از ۱/۵ تا ۶/۵ میکرومتر) بوده و در کشت‌های قدیمی نیز دیواره عرضی دیده شد. آنتریدی از محل زیر دیواره عرضی اگون منشعب می‌شود (فرم monoclinous). ائوگون در انتهای هیف واقع شده، صاف و کروی به قطر متوسط ۲۱/۸۲ میکرومتر (از ۱۹/۶ میکرومتر تا ۲۲/۹ میکرومتر) که روی محیط PDA استاندارد تولید شد. در هر ائوگون یک ائوسپور تشکیل گردید. دیواره ائوسپور صاف به قطر متوسط ۱۷/۱۵ میکرومتر (از ۱۶/۸۴ تا ۱۸/۱۶) و دارای دیواره دو لایه بوده که سیتوپلاسم را در بر می‌گیرد. ائوسپورهای این قارچ معمولا بلافاصله یا پس از یک دوره استراحت (اغلب هفت ماه) جوانه زدند. این گونه روی محیط PDA اسپورانژهای کروی با دیواره صاف تولید نمود. با استفاده ازفرمول‌های دیک (۱۹۹۰) شاخص‌های ذیل برای ۲۰ اگون بدست آمد: شاخص آپلروتیک= ۴۸/۷۵، شاخص دیواره = ۳۹/۴۵ و شاخص ائوپلاست = ۲۵/۵۲.

جداسازی و شناسایی و تشخیص گونه‌های سودوموناسهای فلورسنت

اغلب کلنی‌های رشد یافته روی محیط اختصاصی "اس یک" تولید رنگدانه فلورسنت کردند. حداقل قدرت جداسازی این محیط کشت ۸۰ درصد و در برخی مناطق از جمله مزارع خمین تا ۹۰ درصد بود. نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای تشخیص گونه‌های *Pseudomonas* در جدول ۲ ذکر شده

1 . Colony forming unit

Archive of SID

www.SID.ir

است. واکنش اکسیداز در گونه‌های مختلف این جنس متفاوت ولی برای تمام جدایه‌های متعلق به گونه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* مثبت است. همگی گرم منفی و کاتالاز مثبت می‌باشند. سودوموناسها عموما قادر به احیای نیترات نیستند ولی جدایه‌های *P. fluorescens* می‌توانند از نیترات به عنوان گیرنده نهایی الکترون در مسیر تنفسی استفاده نموده و آنرا احیا کنند. جدایه‌های *P. putida* قادر به احیای نیترات نیستند. همچنین گونه *P. putida* برخلاف گونه *P. fluorescens* قادر به استفاده از قند ترهالوز نمی‌باشد. از این دو واکنش اخیر می‌توان برای تفکیک دو گونه استفاده نمود. البته برخی از بیووارهای گونه *P. fluorescens* نیز قادر به احیای نیترات نیستند. همانگونه که در جدول ۲ دیده می‌شود هیچ یک از گونه‌ها در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد رشد نکرد ولی همگی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. همچنین هیچ یک از باکتریها قادر به تحمل KCN یک درصد و تولید سولفید هیدروژن از پپتون نبودند. با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی، جدایه‌های Pf18 و Pf23 (جدا شده از مزارع لوبیای شهرستان خمین) و جدایه Pf26 از مزارع لوبیای دانشکده کشاورزی کرج به عنوان گونه *P. putida* تشخیص داده شدند. جدایه‌های Pf13 و Pf22 بعلت عدم قطعیت در تشخیص به عنوان *Pseudomonas sp.* در نظر گرفته شدند. اگرچه این دو جدایه تولید رنگدانه فلورسنت نیز نمودند.

تعیین جمعیت باکتریها روی بذور تیمار شده لوبیا

شمارش کلنی‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت کینگ ب (برای سودوموناسهای فلورسنت) و آگار مغذی (برای باسیلها) نشان داد که متوسط جمعیت باکتری روی بذر معادل ۱×۱۰^{۷} واحد تشکیل دهنده کلنی بود.

اثر ریزوباکتریها در جلوگیری از رشد گونه *Pythium ultimum* در شرایط آزمایشگاهی

همانگونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود در مورد جلوگیری از رشد گونه *P.ultimum* روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA)، جدایه‌های Pf8, Pf15, Pf16, Pf26, Pf27 و نیز استرین CHAO بهترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ داشتند (گروه a). جدایه‌های Pf3, Pf4, Pf5, Pf30, Pf32, Pf6 و نیز Bs2, Bs3, Bs5 در رتبه بعدی قرار گرفتند (گروه ab). جدایه‌های Bs4, Pf6 و Pf20 هیچ گونه تأثیری در کاهش رشد قارچ نداشتند. جدایه‌های Pf3, Pf7, Pf9, Pf10, Pf14, Pf18, Pf19, Pf21, Pf24، و Pf31 کمترین تأثیر را روی رشد قارچ داشتند (گروه c).

بررسی امکان محافظت از بذر در مقابل قارچ‌های بیماریزا درون پتری

گونه *P. ultimum* بشدت از جوانه‌زنی بذور در محیط کشت همانند محیط زنده ممانعت می‌کند. همانگونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود به غیر از ۱۰ جدایه شامل جدایه‌های Pf6, Pf9, Pf10, Pf14, Pf19, Pf20, Pf24, Pf25, Pf29 و Pf31 که قادر به محافظت از بذر نبودند بقیه باکتریها با ممانعت از رشد قارچ عامل بیماری، امکان جوانه‌زنی بذر لوبیا در محیط کشت را باعث شدند. ترکیب تجارتی تریکودرمین نیز نتوانست باعث حفاظت از بذر بشود.

بررسی تولید برخی از متابولیتهای ضد میکروبی بوسیله ریزوباکتریها

تولید سیانید هیدروژن

از بین ریزوباکتریهای آنتاگونیست مورد استفاده فقط جدایه‌های Pf2, Pf4, Pf8, Pf9, Pf13, Pf14, Pf15, Pf16, Pf18, Pf22, Pf26, Pf27, Pf28, Pf31 و Pf32 و نیز استرین CHAO تولید سیانید هیدروژن کردند (جدول ۱). در سایر جدایه‌ها تولید این متابولیت به اثبات نرسید.

تولید پروتئاز

جدایه‌های Pf1, Pf5, Pf6, Pf7, Pf12, Pf15, Pf20, Pf21, Pf23, Pf25, Pf27, Pf28 و Pf32 و نیز استرین CHAO تولید پروتئاز کردند. هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتریها از نظر اندازه تقریبا با یکدیگر یکسان بودند (جدول ۱). در سایر جدایه‌ها تولید این آنزیم به اثبات نرسید.

تولید سیدروفور

از نظر تولید سیدروفور روی محیط کشت CAS، جدایه‌های Pf1, Pf13, Pf16, Pf26, Pf27 و Pf32 و نیز استرین CHAO با توجه به اندازه قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتریها بیشترین تولید سیدروفور را داشتند. جدایه‌های Pf3, Pf4, Pf5, Pf6, Pf7, Pf8, Pf12, Pf14, Pf15, Pf18, Pf19, Pf21, Pf22 Pf24, Pf25, Pf28, Pf29, Pf31, Pf33 و Pf34 نیز بخوبی تولید سیدروفور نمودند. جدایه‌های *B. subtilis* و نیز جدایه‌های Pf11, Pf17, Pf20 و Pf23 اصلا تولید سیدروفور نکردند. جدایه‌های Pf2, Pf9, Pf10 و Pf30 نیز مقدار کمی تولید کردند (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی و کنترل عامل بیماری در آزمایشگاه و گلخانه

تیمار	ناحیه بازداری(۱)	تولید سیانید هیدروژن(۳)	تولید سیدروفور(۴)	تولید پروتئاز(۵)	وزن تر بوته بر حسب گرم(۶)	درصد جوانه‌زنی (۷)	حفاظت از بذر(درون پتری)
CHAO	(۲)a۳/۲	+	+++	+	ab۲۰/۷	ab۸۶	+
Pf 1	b۱/۲	-	+++	+	bc۱۵/۶	bc۷۳	+
Pf 2	ab۲/۴	+	+	-	cd۱۲/۷	c۷۱	+
Pf 3	c۰/۴	-	++	-	cd۱۲/۷	c۶۸	-
Bs 1	b۱/۳	-	-	-	cd۱۲/۸	c۶۸	-
Bs 2	ab۱/۹	-	-	-	cd۱۲/۵	c۶۷	+
Bs 3	ab۲/۱	-	-	-	bc۱۵/۶	c۶۸	+
Bs 4	۰	-	-	-	bc۱۵/۴	bc۷۳	-
Bs 5	ab۱/۸	-	-	-	bc۱۵/۴	bc۷۲	+
Bs 6	b۱/۲	-	-	-	c۱۴/۷	c۷۱	+
Pf 4	ab۲/۱	+	++	-	ab۲۰/۸	ab۸۶	+
Pf 5	ab۲/۳	-	++	+	bc۱۵/۶	bc۷۳	+
Pf 6	۰	-	++	+	ab۲۰/۸	ab۸۵	-
Pf 7	c۰/۹	-	++	+	b۱۸/۶	b۸۱	+
Pf 8	a۲/۹	+	++	-	bc۱۵/۸	bc۷۳	+
Pf 9	c۰/۵	+	+	-	cd۱۲/۷	c۶۷	-
Pf 10	c۰/۹	-	+	-	bc۱۵/۲	bc۷۳	-
Pf 11	b۱/۲	-	-	-	d۹/۸	d۴۹	+
Pf 12	b۱/۲	-	++	+	cd۱۲/۶	c۶۸	+
Pf 13	b۱/۴	+	+++	-	cd۱۲/۸	c۶۷	+
Pf 14	c۰/۶	+	++	-	bc۱۵/۲	bc۷۲	-
Pf 15	a۲/۸	+	++	+	b۱۸/۵	b۸۱	+
Pf 16	a۳/۲	+	+++	-	a۲۵/۲	a۹۲	+
Pf 17	b۱/۱	-	-	-	bc۱۵/۶	bc۷۳	+
Pf 18	c۰/۸	+	++	-	cd۱۱/۸	c۶۴	+
Pf 19	c۰/۵	-	++	-	bc۱۵/۴	bc۷۴	-
Pf 20	۰	-	-	+	bc۱۶/۲	bc۷۶	-
Pf 21	c۰/۸	-	++	+	b۱۸/۴	b۸۲	+
Pf 22	b۱/۳	+	++	-	bc۱۵/۴	bc۷۲	+
Pf 23	b۱/۴	-	-	+	cd۱۲/۶	cd۶۱	+
Pf 24	c۰/۵	-	++	-	d۹/۸	d۴۸	-
Pf 25	b۱/۲	-	++	+	b۱۸/۴	b۸۱	-
Pf 26	a۳/۲	+	+++	-	a۲۵/۶	ab۸۶	+
Pf 27	a۳/۲	+	+++	+	ab۲۲/۵	ab۸۹	+
Pf 28	b۱/۲	+	++	+	bc۱۶/۸	bc۷۸	+
Pf 29	b۱/۱	-	++	-	ab۲۰/۵	b۸۴	-
Pf 30	ab۲/۳	-	+	-	c۱۴/۷	c۷۱	+
Pf 31	c۰/۵	+	++	-	bc۱۵/۶	bc۷۴	-
Pf 32	ab۲/۴	+	+++	+	ab۲۰/۵	ab۸۶	+
Pf 33	ab۲/۳	-	++	-	c۱۴/۸	bc۷۲	+
Pf 34	b۱/۱	-	++	+	bc۱۵/۵	bc۷۳	+
قارچ‌کش	-				b۱۸/۲	b۸۶	+
تریکودرمین	-				b۱۷/۸	b۸۰	-
شاهد آلوده	-				d۸/۷	d۴۵	-
شاهد سالم	-				a۲۸/۲	a۹۷	+

۱- فاصله بین میسلیوم و کلنی باکتری بر حسب سانتی‌متر. ۲- اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند. ۳- تولید سیانید براساس آبی‌رنگ شدن کاغذ آغشته به معرف تعیین شده است. ۴- هاله نارنجی اطراف کلنی باکتری نشانه تولید سیدروفور است. ۵- فعالیت پروتئاز براساس بی‌رنگ نمودن محیط SMA تعیین گردید. ۶- وزن تر بوته‌ها دو هفته پس از کاشت تعیین شد. در هر گلدان ۱۰ عدد بذر و برای هر تیمار سه تکرار استفاده شد. ۷- تعداد بذور جوانه زده و سر پا پس از یک هفته شمارش شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- واکنش‌های بیوشیمیایی سودوموناسهای فلورسنت

کد	واکنش گرم	احیای نیترات	کاتالاز	ذوب ژلاتین	اکسیداز	تولید لوان	آرژنین دهیدرولاز	رشد در ۴ درجه	رشد در ۴۱ درجه	رشد روی ترهالوز	رنگدانه فلورسنت	تولید H2S از پپتون	تحمل ۱٪KCN	اوره آز
CHA0	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 4	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 6	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	م
Pf 7	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 8	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 9	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 10	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 11	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 12	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 13	-	ن	+	+	+	+	ن	+	-	+	+	-	-	ن
Pf 14	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	م
Pf 15	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 16	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 17	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 18	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Pf 19	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 20	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 21	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 22	-	ن	+	+	+	+	ن	+	-	+	+	ن	-	ن
Pf 23	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Pf 24	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 25	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 26	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	م
Pf 27	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Pf 28	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 29	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 30	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 31	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 32	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 33	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Pf 34	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-

ن: (نامشخص) م: (متغیر) +: (مثبت) -: (منفی)

جدول ۳- واکنش متقابل بین تعدادی از متابولیت‌های مربوط به جدایه‌های ریزوباکتری و فعالیت ضد قارچی آنها در شرایط گلخانه

متغیر	ضریب همبستگی (r) *P. ultimum*
ایجاد هاله بازدارندگی	۰/۴۴
تولید سیدروفور	۰/۳۱
تولید سیانید هیدروژن	۰/۲۸
تولید پروتئاز	۰/۱۸

همبستگی در سطح ۱٪ تعیین شده است.

تولید سلولاز

هیچ یک از جدایه‌های مورد آزمایش نتوانستند درون لوله آزمایش حاوی محیط سلولاز باعث تغییر رنگ کاغذ صافی بشوند. لذا تولید آنزیم سلولاز با این روش به اثبات نرسید.

بررسی اثرجدایه‌های ریزوباکتری در کاهش بیماری ناشی از گونه *Pythium ultimum* در گلخانه

بررسی اثر ریزوباکتریها در خاک آلوده به گونه*P. ultimum*

Archive of SID
www.SID.ir

نشان داد که جدایه‌های Pf16 و Pf26 بهترین تأثیر را در افزایش وزن تر بوته‌های لوبیا در شرایط گلخانه داشتند و به همراه شاهد سالم در یک گروه قرار گرفتند (گروه a). پس از آن جدایه‌های Pf4, Pf6, Pf27, Pf29 و Pf32 و نیز استرین CHAO در رتبه بعدی جای گرفتند (گروه ab). قارچ‌کش متالاکسیل تأثیر متوسطی روی کاهش بیماری داشت و به همراه جدایه‌های Bs4, Pf7, Pf15, Pf21 و Pf25 و ترکیب تجاری تریکودرمین در یک گروه بودند (گروه b). جدایه‌های Pf11 و Pf24 هیچگونه تأثیری نداشته و به همراه شاهد آلوده در یک گروه قرار گرفتند (گروه d). کمترین تأثیر نیز مربوط به جدایه‌های Pf2, Pf3, Bs1, Bs2, Pf9, Pf12, Pf13, Pf18 و Pf23 بود (گروه cd). نتایج در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

نتایج حاصل از تأثیر این باکتریها روی جوانه‌زنی بذور نیز بررسی شد. بهترین تأثیر مربوط به جدایه Pf16 بود که به همراه شاهد سالم در یک گروه قرار گرفتند (گروه a) و پس از آن جدایه‌های Pf4, Pf6, Pf26, Pf27, Pf29, Pf32 و نیز استرین CHAO در رتبه بعدی واقع شدند (گروه ab). قارچ‌کش متالاکسیل تأثیر متوسطی روی محافظت از بذور و امکان جوانه‌زنی آنها داشت و به همراه جدایه‌های Pf7, Pf15, Pf21, Pf25, Pf29 و ترکیب تجاری تریکودرمین در یک گروه قرار گرفتند (گروه d) و کمترین تأثیر نیز مربوط به جدایه Pf23 بود (گروه cd).

بررسی قدرت کلونیزاسیون ریشه‌های لوبیا توسط ریزوباکتریهای آنتاگونیست

نتایج حاصل از شمارش کلنی باکتریهای رشد یافته روی محیط کشت مربوط به ریشه‌های لوبیای درون خاک آلوده به قارچ *P. ultimum* پس از دو هفته نشان داد که بیشترین قدرت کلونیزاسیون ریشه مربوط به جدایه‌هایPf4, Pf7, Pf13 و Pf28 بود (گروه a). در این گروه جمعیت باکتری به ترتیب به ۱ /۸، ۸/۲، ۸/۱ و ۸/۲ رسید. پس از آن جدایه‌های Pf5, Pf17, Pf25 و استرین CHAO در رتبه دوم قرار گرفتند (گروه ab). در این گروه جمعیت باکتری به ۷/۶ رسید. کمترین قدرت کلونیزاسیون مربوط به جدایه‌های Bs2, Bs4, Bs5, Bs6, Pf16, Pf22 و Pf31 بود (گروه c). در این گروه جمعیت باکتری به ۶/۸ رسید.

بحث

بررسی‌ها نشان داد که سودوموناسهای فلورسنت بطور فعال در اغلب خاکهای زراعی وجود داشته و احتمالا مسئول کاهش طبیعی برخی از بیماری‌های ریشه ناشی از عوامل خاک زی می‌باشد. اغلب سودوموناسهای فلورسنت جدا شده از ریزوسفر لوبیا از نظر خواص آنتاگونیستی در آزمایشگاه و گلخانه اثرات قابل توجهی از خود نشان دادند. بر اساس مطالعات و بررسی‌های بعمل آمده تاکنون در خصوص کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی بذر، ریشه و بوته‌میری ناشی از بیمارگرهای *P.ultimum* روی لوبیا با استفاده از سودوموناسهای فلورسنت هیچ گونه فعالیت پژوهشی صورت نگرفته است و این تحقیق برای اولین بار روی لوبیا صورت می‌گیرد. گونه *P. ultimum* در اغلب مناطق کشور به عنوان یکی از عوامل محدود کننده محصولات زراعی مختلف از جمله حبوبات محسوب شده و باعث ایجاد خسارت تا ۳۰٪ محصول می‌شود (۲). معمولا جداسازی این قارچ به تمهیدات خاصی برای حذف سایر میکروارگانیسم‌های ساپروفیت نیاز دارد و به آسانی قابل جداسازی نمی‌باشد. این قارچ دارای دو واریته می‌باشد که یکی تولید زئوسپور می‌کند (واریته *sporangigerum*) و دیگری تولید ائوسپورانژ و زئوسپور نمی‌کند (واریته *ultimum*). گونه جدا شده از مزارع دانشکده کشاورزی لوبیا، با توجه به تولید زئوسپور و سایر شاخص‌های محاسبه شده به عنوان واریته *sporangiferum* شناسایی شد. شاخص ائوپلاست در واریته *sporngiferum* همواره از ۲۵ درصد بیشتر است در حالی که در واریته *ultimum* از ۲۰ درصد بیشتر نیست. در هیچ‌یک از تحقیقات قبلی روی لوبیا در ایران اشاره‌ای به نوع واریته‌ای این قارچ نشده است.

این قارچ از بذور پوسیده شده و نیز گیاهانی که بتازگی سر از خاک درآورده‌اند قابل جداسازی است. استفاده از آنتی‌بیوتیک ریفمپیسین به میزان ۵۰ میکروگرم در لیتر محیط کشت امکان جداسازی این قارچ را فراهم می‌سازد. لازم به ذکر است که قبلا واریته *P. ultimum* var. *ultimum* توسط احمدزاده و همکاران (۱۳۷۶) روی نخود ایرانی از مزارع دانشکده کشاورزی گزارش شده و به نظر می‌رسد که هر دو واریته در این مزارع فعالیت دارد (۱).

Archive of SID

www.SID.ir

محیط اس‌یک یک محیط انتخابی و افتراقی برای سودوموناسهای فلورسنت محسوب می‌شود (۸). قدرت انتخابی این محیط بدلیل وجود دو ماده سدیم لائورویل ساکوزین (SLS)[1] و آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم[2] است که اولی از رشد میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و دومی از رشد سودوموناسهای غیرفلورسنت جلوگیری می‌کند. همچنین این دو ماده دارای اثر تشدید کننده روی یکدیگر داشته و حذف یکی باعث کاهش تأثیر دیگری می‌شود. نتایج بدست آمده از جداسازی باکتریها از مزارع کرج و خمین نشان داد که کارآیی این محیط برای جداسازی سودوموناسهای فلورسنت حداقل ۸۰ درصد بود. این موضوع با نتایج گولد و همکاران (۱۹۸۵) مطابقت دارد. بنظر می‌رسد کارآیی بیشتر این محیط در مزارع خمین (که اغلب سالها بصورت متناوب با گندم کاشته می‌شود) نسبت به سایر مناطق، جمعیت بیشتر سودوموناسهای فلورسنت در خاک باشد. بنا بر نظر ولر (۱۹۸۸) تناوب گیاهان تیره بقولات با گندم نقش مؤثری در افزایش جمعیت سودوموناسهای فلورسنت دارد. این تناوب معمولا در مزرعه دانشکده کشاورزی کرج رعایت می‌شود.

تمام باکتریهای متعلق به جنس *Pseudomonas*، گرم منفی، میله‌ای شکل و دارای یک تا چند تاژک قطبی می‌باشند. به غیر از گونه *P. corrugata*، هیچ سودوموناسی در ۴۱ درجه سانتی‌گراد رشد نمی‌کند و از د- آرابینوز به عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط می‌توانند استفاده نمایند. هیچگونه فرم مقاومی برای این جنس شناخته نشده است. گونه *P.fluorescens* دارای پنج بیووار مختلف می‌باشد که از نظر مصرف برخی قندها قابل تفکیک و شناسایی هستند.

در جدول ۳ ضرایب همبستگی بین تعدادی از متغیرهای مؤثر در پدیده کنترل بیولوژیکی با کنترل بیماری ناشی از بیمارگرهای *P. ultimum* و *R. solani* در شرایط گلخانه ذکر شده است.

ضریب همبستگی پیرسون[3] برای مقایسه متغیرهای مربوط به تولید سیدروفور، پروتئاز، سیانید هیدروژن و ایجاد هاله بازدارندگی در تشتک پتری با فعالیت ضدقارچی آنها در شرایط گلخانه تعیین شد. تجزیه واریانس اعداد بدست آمده با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SPSS نشان داد که هیچگونه همبستگی بین هر یک از متغیرهای مذکور با فعالیت ضد قارچی باکتریها در شرایط گلخانه دیده نمی‌شود. بیشترین ضریب همبستگی مربوط به ایجاد هاله بازدارندگی در پتری (۰/۴۴) و کمترین آن مربوط به تولید پروتئاز است (۰/۱۸).

سایر ضرایب همبستگی بین متغیرهای مختلف در کنترل بیولوژیکی بشرح زیر تعیین گردید:

۱- ضریب همبستگی بین قدرت جلوگیری از رشد گونه *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاهی با قدرت جلوگیری از رشد قارچ در شرایط گلخانه ۰/۴۷

۲- ضریب همبستگی بین قدرت جلوگیری از رشد گونه *P. ultimum* در شرایط گلخانه با قدرت کلونیزاسیون ریشه توسط ریزوباکتریها ۰/۱۴

ضریب همبستگی بین نتایج بازداری از رشد قارچ های بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی با نتایج بدست آمده از نتایج کارهای گلخانه ای معنی‌دار نشد. این نتیجه‌گیری نیز با یافته‌های برخی از محققین از جمله، شریفی تهرانی و همکاران (۱۹۹۸) و کارهای هاجدرون و همکاران (۱۹۸۹) مطابقت دارد.

با توجه به نتایج ضریب همبستگی تولید سیدروفور با قدرت کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای به نظر می‌رسد که همبستگی معنی‌داری بین این دو وجود ندارد. بر اساس نتایج یک کار تحقیقاتی، سیدروفور تولید شده توسط استرین *P. fluorescens* CHAO در کنترل بیماری‌های پوسیدگی سیاه ریشه توتون و پاخوره گندم اثر چندانی ندارد (۱۳). همچنین نتایج یک تحقیق نشان داد که تولید سیدروفور توسط استرین *P.putida* WCS417 نقش چندانی در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک ندارد. موتانهایی که تولید سیدروفور نمی‌کردند نیز تأثیر خوبی در کنترل این بیماری داشت ولی کلونیزاسیون ریشه بخوبی صورت نگرفت (۶).

در آزمایش‌های انجام شده هیچگونه همبستگی بین متغیرهای مورد بررسی با فعالیت ضد قارچی باکتریهای آنتاگونیست در شرایط گلخانه وجود نداشت. جدایه‌های Pf15, Pf27, Pf27, Pf32 و استرین CHAO تولید هر سه ماده سیدرفور، پروتئاز و سیانید هیدروژن کردند در حالیکه

1 . Sodium Lauroyl Sarcosine
2 . Trimethoprim
3 . pearson

Archive of SID
www.SID.ir

گروه‌بندی آنها از نظر تأثیر روی وزن تر بوته لوبیا به ترتیب در رتبه‌های دوم، سوم، سوم، چهارم و دوم بود. جدایه Pf16، که در آزمایش‌های گلخانه‌ای بهترین اثر را داشت از نظر تولید سیانید و سیدروفور و هاله بازدارندگی نیز بالاترین رتبه را داشت ولی تولید پروتئاز نکرد. در مورد جدایه‌هایی که هیچ یک از مواد آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، سیانید و پروتئاز را تولید نکردند ولی اثر خوبی روی جوانه‌زنی داشتند بنظر می‌رسد از طریق کلونیزه نمودن سطوح بذر در حال جوانه‌زنی و ریشه باعث حفاظت فیزیکی می‌شوند. لازم است تحقیقات تکمیلی در خصوص بهترین شرایط اکولوژیکی برای فعالیت آنتاگونیستی، رشد و بقای باکتری و نحوه کاربرد مایه تلقیح در سطح مزرعه ادامه براساس نتایج محاسبه جمعیت اولیه باکتریها روی بذور و تعیین جمعیت باکتریها روی ریشه پس از دو هفته در خاک آلوده به گونه *P. ultimum* می‌توان گفت که اغلب جدایه‌های ریزوباکتری توانستند جمعیت اولیه خود را نه تنها حفظ نمایند بلکه از ۷/۳ (محاسبه لگاریتمی میزان واحد تشکیل دهنده کلنی) به ۷/۶ (در جدایه‌های Pf5, Pf17, Pf5 و استرین CHAO)، ۸/۱ (در جدایه‌های Pf4 و Pf13) و ۸/۲ (در جدایه‌های Pf7 و Pf28) برسانند که نشانه توانایی این باکتریها برای رقابت و کلونیزه نمودن ریشه لوبیا در خاک می‌باشد. در برخی جدایه‌ها جمعیت باکتری از ۷/۳ به ۶/۸ کاهش یافت. اغلب جدایه‌های *B. subtilis* قادر به کلونیزه کردن ریشه نبودند. ضریب همبستگی این متغیر (قدرت کلونیزاسیون) با توانایی جلوگیری از بیماری ناشی از گونه *P. ultimum* در شرایط گلخانه ۰/۱۴ محاسبه گردید که نشانه عدم همبستگی بین آنها می‌باشد. معمولا توانایی یک باکتری برای کلونیزاسیون ریشه شرط لازم (نه کافی) برای فعالیت کنترل بیولوژیکی علیه قارچ‌های بیمارگر بشمار می‌رود (۱۳).

در مجموع از بین ۴۱ جدایه مورد استفاده در آزمایش اثر ریزوباکتریها در جلوگیری از رشد قارچ‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی، تنها ۶ جدایه توانست بخوبی از رشد گونه *P. ultimum* ممانعت کند. ۳ جدایه نیز اصلا تأثیری نداشتند و ۱۰ جدایه نیز تأثیر ناچیزی در کاهش رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی نشان داد.

در مورد تولید سیانید و پروتئاز توسط ریزوباکتریهای مورد استفاده، از بین ۴۱ جدایه تنها ۱۶ جدایه توانست تولید سیانید هیدروژن نموده و کاغذ صافی آغشته به معرف را به رنگ آبی درآورد. همانطور که انتظار می‌رفت هیچ یک از جدایه‌های *B. subtilis* تولید سیانید نکرد. بر اساس یک کار تحقیقاتی، حداقل ۴۰ درصد سودوموناسهای که از ریزوسفر سیب‌زمینی جداسازی شده بودند در شرایط آزمایشگاهی تولید سیانید هیدروژن کردند (۲۱). ۱۵ جدایه نیز تولید آنزیم پروتئاز کردند. در مورد جدایه‌های *B. subtilis* تولید پروتئاز روی محیط کشت SMA به اثبات نرسید. به غیر از جدایه‌های *B. subtilis* و چهار جدایه از سودوموناسهای فلورسنت بقیه آنها بخوبی تولید سیدروفور کردند.

استرین CHAO در شرایط گلخانه‌ای درون خاک استریل تأثیر قابل توجهی روی بیماری‌های ناشی از گونه *P. ultimum* داشت و بر روی گونه *P. ultimum* تأثیر بهتری نسبت به قارچ‌کش متالاکسیل داشت. بر اساس نتایج کارهای تارپرو-کاساس و همکاران (۱۹۹۰) تیمار بذور نخود با باکتری *P. fluorescens* استرین Q29z-80 تأثیر مشابهی با کاربرد قارچ‌کشهای متالاکسیل و کاپتان در شرایط مزرعه داشت (۲۱). جدایه‌های Pf16 و Pf26 تنها باکتریهایی بودند که در کاهش رشد عامل بیماری در شرایط گلخانه اثرات خوبی داشتند. جدایه Pf16 در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بالایی داشته و همچنین از نظر تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن در سطح بالایی بود. این جدایه تولید پروتئاز نکرد ولی نسبت به سایر جدایه‌ها توانایی کمتری برای کلونیزاسیون ریشه لوبیا داشت. جدایه Pf26 تولید پروتئاز و سیانید هیدروژن نکرد ولی تولید سیدروفور کرد. این جدایه نیز از نظر کلونیزاسیون ریشه لوبیا مشابه جدایه Pf16 بود.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات طرح ملی بررسی اثر آنتاگونیستهای باکتریایی روی قارچ‌های مهم خاکزی عوامل بوته‌میری گیاهان در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شده است. از دکتر دفاگو ازکشور سوئیس بخاطر ارسال استرین CHAO *P. fluorescens* و رهنمودهای ارزنده صمیمانه قدردانی می شود.

Archive of SID

www.SID.ir

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. احمدزاده، م. شریفی تهرانی، ع. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۶. جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر نخود ایرانی و بررسی مکانیسم بازدارندگی علیه قارچ عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۸ شماره ۳.

۲. اخوت، م. کایزر، و. و غ. مصاحبی. ۱۳۴۶. بررسی بیماری‌های بقولات در ایران. مجله بیماری‌های گیاهی شماره ۳ سال چهارم.

3. Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biologial control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 25:67-85.

4. Castric, K.F. & P. A. Castric. 1983. Method for rapid detection of cyanogonic bacteria. Appl . Environ. Microbiol. 54:701-702.

5. Dick, M.W. 1990. Key to *Pythium*. Department of botany School of plant sciences, University of Reading. 64pp.

6. Duiiff, B.J., J. W. Meijer, P. A. H. M. Bakker, & B. Schippers. 1990. Supprression of Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas in soil; mode of action. pp. 152-161. *In* keel C., koller B. and Defago G. (eds). Plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth - promoting rhizobaceria. Interlacen, Switzerland.

7. Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseaes. Ann. Rev. Phtyopatol. 26:75-91.

8. Gould, W.D., C. Hagedron, T. R. Bardinelii, & R. Zablotowicz .1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent Pseudomonads from various habitats. Appl. Environ. Microbiol. 49:28–32.

9. Howell, C.R., & R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic producd by the bacterium .Phytopathology 28-84:96.

10. Howell, C.R. & R. D. Stipanovic. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* - induced darnping- off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* an its antibiotic. pyoluteorin. Phytopathology 70:712-715.

11. Kaiser, W.J., R. M. Hannan. & D. M. Weller. 1989. Biological control of seed rot and pre emergence damping - off of chickpea with fluorescent pseudomonads. Soil Biol. Biochem. 21:269-273.

12. Keel, C., D. M. Weller, A. Natsch, G. Defago, R. J. Cook, & L. S. Thomashow. 1996. Conservation of the 2,4- diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent pseudomonas strains from diverse geographic locations. Appl. Environ. Microbiol. 62:552-563.

13. Keel, C. & G. Defago. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gange AC, Brown VK, eds. Multitronhic interactions in terrestrial system. Oxford: Blackwell Science. 27-47.

14. Leong, J. 1986. Siderophore: their biocheistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 24:187-209.

15. Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Haas, & G. Defago. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. Phyopathology. 82:190-195.

16. Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas, & G. Defago. 1994. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced production. Plant pathology, 44:40-50.

17. Sharifi –Tehrani, A., Y. Zaia, Moenn-Oaccoz, & G. Defago. 1998. Biocoontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by fluorescent pseudomanads. Jaurnal of Med. Fac. Univ. Gent, 64/3b:425-429.

18. Schaad, N.W., J. B. Jones, & W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press. 373 pp.

19. Scher, F.M. & R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in Fusarium- suppressive soil. Phytoparhology. 70:412-417.

20. Schippers, B., A. W. Bakker, & A. H. M. Bakker. 1987. lntractions of deleterious and and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytopathol. 25:339-59.

21. Tarpero-Casas, A., W. J. Kaiser, & D. M. Ingram. 1990. Control of *Pythium* seed rot pre emergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. Plant Dis. 74:563-569.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Waterhouse, G.M. 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Mycological papers. Commonwealth Mycological Institude, Kew. 109:1-15.
23. Weller, D.M. 1988. Biological control of soillbome plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379–407.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of Fluorescent Pseudomonads on *Pythium ultimum* Casual Agent of Seed Rot of Common Bean

M. AHMADZADEH[1], A. SHARIFI-TEHRANI[2], GH. HEJAROUD[3], J. ZAD[4], M. OKHOVVAT[5], AND M. MOHAMMADI[6]
1, 2, 3, 4, 5, 6, Ph.D. Student , Professorsand assistant professor,
Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
Accepted April. 16, 2003

SUMMARY

Biological control of soil-borne fungal diseases of plants has received a serious attention among plant pathologists in recent years. In this regard, antagonistic rhizobacteria, more specifically fluorescent pseudomonads and certain species of Bacillus, are known to control fungal as well as bacterial root diseases of agronomic crops. Rhizospheric microorganisms are thought to be a suitable candidate for biological control since rhizosphere is considered the first line of defense for roots against soil-borne pathogens. In this study, a total of 41 bacterial strains were tested as potential biological control agents against damping off and root rot fungal diseases caused by *Pythium ultimum*. The least isolation capability of S1 medium for fluorescent pseudomonads was 80% and in some regions including the fields in Khoumain, Markazi province, it was up to 90%. Two isolates were identified as Pseudomonas sp., three isolates as P. putida and the rest were *P. fluorescens*. Isolates Pf8, Pf15, Pf16, Pf26, Pf27 and CHA0 showed the most inhibitory effects against the in vitro growth of *P. ultimum*. Isolates Bs4, Pf6 and Pf20 had no inhibitory effect on *P. ultimum*. A total of 16 isolates including Pf2, Pf4, Pf8, Pf9, Pf13, Pf14, Pf15, Pf16, Pf18, Pf22, Pf26, Pf27, Pf28, Pf31, Pf32 and CHA0 produced hydrogen cyanide. Fourteen isolates including Pf1, Pf5, Pf6, Pf7, Pf12, Pf15, Pf20, Pf21, Pf23, Pf25, Pf27, Pf28, Pf 32 and CHA0 produced protease. Bacterial isolates that generated siderophore included Pf1, Pf13, Pf16, Pf26, Pf27, Pf32 and CHA0. Neither *Bacillus subtilis* isolates nor those belonging to P. fluorescens, Pf11, Pf17, Pf20 and Pf23, produced any siderophore. None of the bacterial isolates were able to produce cellulase since there was no change of color on filter paper in a tube containing cellulase. Isolates Pf16 and Pf26 significantly increased the fresh weight of bean plants inoculated with *P. ultimum* under the greenhouse conditions. These strains were placed in the same group as the non-inoculated control was. Isolate Pf16 increased seed germination the most. Isolates Pf4, Pf7, Pf13 and Pf28 were the strongest colonizers of bean roots.

Key words: Bean, Biological control, Fluorescent pseudomonads.

Archive of SID

www.SID.ir